

Lysregulering av melatonin

Prosjektoppgave av:
Stud. med. Henrik Evjen, kull H03
Høsten 2008

Veileder:
Professor dr.med. Jon Storm-Mathisen



Kontaktinformasjon:

Henrik Evjen
Silurveien 44
0380 OSLO

Mobil: 97072140
Email: henrik.evjen@gmail.com

Abstract.....	3
Innledning.....	4
Metode.....	5
MEDLINE.....	5
Keywords.....	5
Begrensninger.....	6
Gjennomgang av søkene.....	6
Resultat.....	8
Forkortelser.....	9
Den fotosensitive retinale gangliecellen.....	9
Litteraturhenvisninger.....	35
De cirkadianske rytmene.....	9
Oppdagelsen av pRGC hos pattedyr.....	11
Fotopigmentet melanopsin.....	12
Oppdagelsen av melanopsin.....	13
Fototransduksjon.....	16
Samarbeid mellom staver, tapper og pRGC.....	18
Overføring til NSC og projeksjoner til andre hjerneavsnitt.....	19
Nucleus suprachiasmaticus.....	21
Rytmegenereringen i NSC.....	21
Faktorer som kan føre til faseforskyvninger i NSC.....	22
Signaler ut fra NSC.....	24
Pinealkjertlen.....	24
Melatoninsyntese.....	24
Regulering av melatoninsyntesen.....	26
Melatonin.....	27
Effekter av melatonin.....	28
Diskusjon.....	31

Abstract

Rather recently a new photoreceptor had been discovered in the human retina. It is responsible for the non-visual detection of light, so that our circadian and neuroendocrine rhythms can be synchronized by the day-night cycle. The photoreceptor is an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell located in the inner retina, unlike the rods and cones that are located in the outer retina. Melanopsin is the functional photopigment used by the new photoreceptor, a photopigment that is much more similar to the opsins of invertebrate rhabdomeric photoreceptors than the opsins of vertebrate ciliary photoreceptors. It seems like the Melanopsin phototransduction cascade is similar to that of the invertebrates, involving G-protein activation and opening of a light-gated channel, leading to depolarization of the cell membrane. This in turn leads to an action potential that follows the retinohypothalamic tract to the suprachiasmatic nucleus in hypothalamus, the location of our biological clock that is responsible for the circadian rhythms. A projection from the suprachiasmatic nucleus to the pineal gland is the main regulatory factor for melatonin production.

Clinically, the new photoreceptor and melatonin are involved in many physiological aspects, involving the phase-shifting the circadian rhythms, affecting the quality of sleep, emotions and psychiatric disorders – most importantly depression. Some studies have even suggested that cognitive functions like learning and memory are involved; others have indicated that somatic diseases like cancer, heart disease and Alzheimer may be affected by imbalances in the daily melatonin rhythms. Much research is necessary to fully understand the cellular physiology and clinical possibilities of light induced regulation of melatonin.

Innledning

Reguleringsprinsipper i hjernen er et spesielt interessant felt innen medisinsk forskning. Dels fordi det er svært komplekst, dels fordi det er svært mye vi ennå ikke forstår – i motsetning til mange andre organsystemer i kroppen. Dette til tross for at hjernen sannsynligvis er vårt viktigste organ i form av å være overordnet resten av kroppen, og involvert i de fleste fysiologiske prosesser som skjer. Det er derfor en fordel å tilnærme seg temaet med ydmykhet og visshet om at veien til full forståelse er svært lang. Det var nok i denne sammenheng mange som stusset da nyheten om at en ny fotoreseptor var oppdaget i menneskets øye. Alle hadde hørt om staver og tapper, og ingen hadde problemer med å gi disse to fotoreseptorene all ære for deteksjon av lys. Likevel viste det seg at det er denne nyoppdagede reseptoren som er ansvarlig for å sende informasjon om lys til det ikke-visuelle systemet vårt, systemet som regulerer døgnrytmen og flere andre funksjoner.

Med denne nye oppdagelsen som utgangspunkt ønsker jeg å beskrive den fysiologiske betydningen som den nye fotoreseptoren har, med fokus på regulering av melatoninsyntesen. Dette innebærer først og fremst å beskrive de mange trinnene og prosessene som må til for at lysstimuli i øyet til slutt kan føre til endring av melatoninproduksjonen i pinealkjertlen. Jeg håper med dette at jeg både kan kaste lys over den spennende og komplekse prosessen som foregår, og samtidig antyde hvilke muligheter en slik dypere forståelse kan ha for oss klinisk sett.

Metode

MEDLINE

Prosjektoppgaven er en litteraturstudie som har tatt utgangspunkt i oversiktsartikler og originalartikler funnet på MEDLINE (Ovid) i august 2008. Hele søkeprosessen ble foretatt fra min hjemmePC. For å få tilgang til fulltekstartiklene måtte jeg ha IP adresse fra Universitetet i Oslo, og jeg benyttet dermed "Remote Desktop Connection" og logget meg på en av skolens datamaskiner ved hjelp av mitt brukernavn og passord. Dermed kunne jeg benytte <http://x-port.uio.no> for å få tilgang til MEDLINE med universitetets IP adresse og med de rettighetene det innebar. Den store fordelen med denne arbeidsmetoden var at det sparte meg for en del tid, samt at jeg kunne være veldig fleksibel i forhold til senere søk dersom jeg i løpet av skrivearbeidet ville se nærmere på artikler som ikke var med i det opprinnelige søket. Jeg opplevde flere ganger at oversiktsartikler ("reviews") refererte til eldre originalartikler som jeg gjerne ville se nærmere på, eventuelt inkludere i litteraturgrunnlaget. Med "Remote Desktop Connection" var det ingen hindring.

Søket etter relevante artikler foregikk på engelsk og startet med en del generelle fritekstsøk som for eksempel "melatonin regulation" eller "light melatonin" for å få en oversikt over omfanget av artikler innen dette fagområdet. Ikke uventet var omfanget stort, og ga mange tusen søkeresultater. Avgrensninger i søket var nødvendig, og "keyword" funksjonen ble benyttet.

Keywords

Jeg satte opp en liste over relevante "keywords" (nøkkelord), og gjennom å se på noen av artiklene jeg tidlig fant fikk jeg en del innspill i forhold til hvilke "keywords" som vanligvis blir brukt i denne typen artikler. Se Tabell 1 for å se hvilke "keywords" som ble med i det endelige søket, og antall søkeresultater dette ga, med begrensningene angitt på neste side.

Keyword (med begrensninger)	Resultat
Retinal ganglion cells	238 artikler
Suprachiasmatic nucleus	86 artikler
Melatonin	72 artikler

Tabell 1: Keywords brukt i litteratursøket på MEDLINE

Begrensninger

Subheadings

Med bruk av "Map term to Subject Heading" kunne jeg gå inn på "subheadings" under de brukte "keywords", og krysse av hvilke underkategorier som skulle være med i søket. Jeg krysset der av på "Anatomy & Histology", "Metabolism" og "Physiology", mens underkategorier som "Cytology" og "Pathology" ble utelatt. Dette begrenset gjerne antall søketreff med ca 40-50%.

Nyere enn 2005

Ettersom mye av kunnskapen vi har om den nye fotosensitive retinale gangliecellen er forholdsvis ny, bestemte jeg meg for å avgrense søket til å gjelde fra 2005 til i dag (august 2008). Gode oversiktsartikler dekket bakgrunnsstoff og de viktigste forskningsresultatene for tiden før 2005, så kunne jeg konsentrere meg om nyere studier.

Kun engelske fulltekstartikler

I tillegg ble "Limit" funksjonen benyttet, slik at søket bare skulle ta med artikler på engelsk. I praksis hadde nok dette liten betydning, ettersom de aller fleste artiklene var på engelsk, men det luket ut en og annen fransk eller japansk artikkel. En annen bruk av "Limit" var at jeg kun ville ha med fulltekstartikler. Også dette hadde nok liten betydning, siden det var veldig få artikler som ikke fantes tilgjengelig i fulltekst. Likevel ble denne begrensningen benyttet fordi det ikke var aktuelt for meg å skaffe artikler gjennom andre kanaler enn elektronisk gjennom Medline.

Gjennomgang av søkene

Etter å ha tastet inn relevante keywords med begrensninger satt jeg igjen med noen hundre artikler. Ved å kombinere ulike keywords, for eksempel "Retinal ganglion cells" og "melatonin", ble søkeresultatet gjerne begrenset til under 20 artikler. Dette vurderte jeg til å være for begrenset, det vil si at jeg hadde gått glipp av mange artikler som hadde vært relevante. Dette skyldes at mange artikler tok for seg relativt spesifikke temaer, for eksempel et enzym i pinealkjertlen, noe som hadde ført til at den ikke ville blitt funnet dersom søket i tillegg til "melatonin" som keyword også hadde hatt et krav om "Retinal ganglion cells" som keyword. For å unngå dette problemet brukte jeg heller litt ekstra tid på å se igjennom alle artiklene som dukket opp per keyword med begrensningene som angitt over. Denne gjennomgangen besto i at jeg først så på tittelen, noe som gjorde at jeg kunne forkaste de fleste artiklene som var med i søkeresultatet. Der hvor tittelen var interessant, leste jeg også sammendraget. Om det også viste at artikkelen var relevant lastet jeg den ned elektronisk, og skrev ut for å få lest den i detalj.

Ved hjelp av denne metoden endte jeg opp med 19 artikler som er blitt brukt i oppgaven, samt 14 artikler som jeg ikke har brukt. De artiklene jeg ikke brukte var enten ikke relevante eller så var temaet bedre behandlet i andre artikler som ble brukt. Blant de 19 artiklene jeg brukte var i blant referanser til tidligere studier som jeg anså som spesielt relevant og viktig. Disse artiklene lastet jeg ned via MEDLINE, og inkluderte i

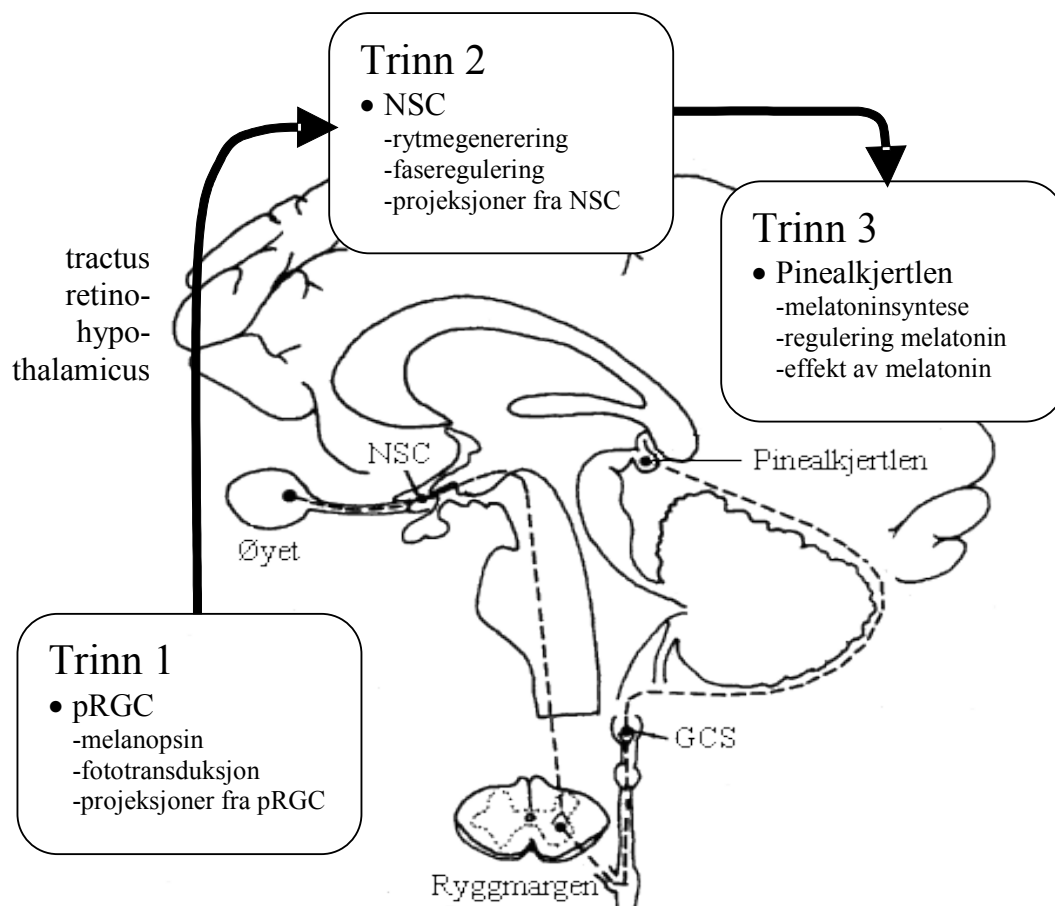
litteraturgrunnlaget for oppgaven. I alt 8 artikler ble funnet på denne måten. Jeg endte på denne måten opp med totalt 27 artikler, samt en bokkilde (se kildehenvisninger).

Som en ekstra kvalitetskontroll så jeg gjennom flere av de artiklene som refererte til artiklene jeg hadde funnet, der det var tilgjengelig. På denne måten kunne jeg oppdage eventuelle uenigheter om resultat, eventuelt nyere resultater og så videre. Imidlertid var mange av artiklene i litteraturgrunnlaget såpass nye at de bare i liten grad ble siterte. For de eldre originalartiklene benyttet jeg ikke denne metoden.

I tillegg til artikler funnet gjennom MEDLINE har jeg også lest gjennom det som står om temaet i diverse lærebøker, og har brukt det som kilde der et tema er bedre beskrevet der enn i artiklene.

Resultat

De viktigste trinnene i prosessen fra lysstimuli til melatoninregulering er angitt i Figur 1. Oppgaven er bygget opp etter disse trinnene, gjerne med en generell beskrivelse av enkeltprosessene først, samt eventuelt litt om hvordan de ble oppdaget. Første trinn er den nye fotoreseptoren, sammen med fotopigmentet melanopsin. Her går jeg også inn på de cirkadianske rytmene, fototransduksjon og spennende funn som kan ha klinisk relevans. Neste trinn er nucleus suprachiasmaticus, vår biologiske klokke, med fokus på hvordan rytmene som genereres blir regulert. Siste trinn er melatoninproduksjonen i pinealkjertlen, også her med fokus på reguleringen av syntesen, samt viktige kjente og potensielle kliniske bruksområder for melatonin.



Figur 1: Oversikt over de ulike trinnene i oppgaven.

Forkortelser

Tabellen under samler de viktigste forkortelsene brukt i denne oppgaven.

Forkortelse	Forklaring
pRGC	fotosensitiv retinal ganglie celle
NSC	nucleus suprachiasmaticus
rd/rd/cl mus	genmodifiserte mus uten funksjonelle staver og tapper
PLC	fosfolipase C
TRPC	transiente reseptorpotensialkanaler
IGL	intergeniculate leaflet
AANAT	arylalkylamin N-acetyltransferase
GCS	ganglion cervicale superius

Tabell 2: De viktigste forkortelsene brukt i oppgaven

Den fotosensitive retinale gangliecellen

Inntil slutten av 1990-tallet var det bred enighet om at det bare fantes to typer fotoreseptorer i øynene; staver og tapper. Øyet var den delen av sentralnervesystemet som man kjente best gjennom over 150 år med forskning, og det var derfor nesten utenkelig at man hadde oversett en tredje type fotoreseptor. Dette synet ble imidlertid drastisk endret da en rekke forsøk viste at mennesket faktisk har en type gangliecelle i netthinnen som er direkte fotosensitiv, og den fotosensitive retinale gangliecellen (pRGC) så dagens lys ¹. Oppdagelsen av den tredje fotoreseptoren i øyet til pattedyr startet med forsøk på å forstå hvordan vår indre klokke reguleres av lys.

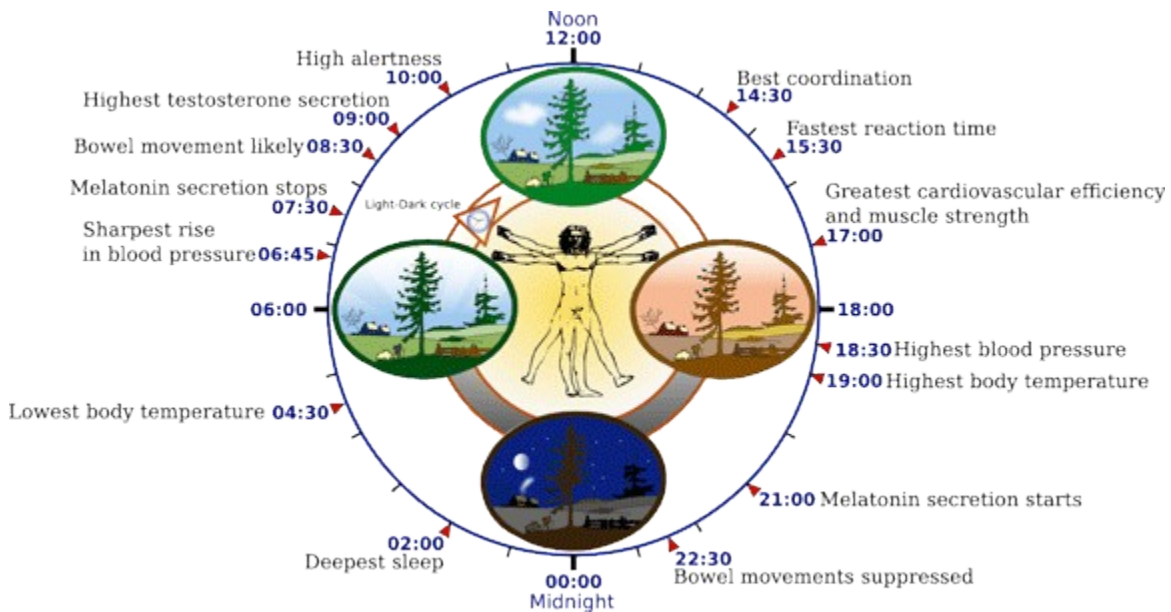
De cirkadianske rytmene

Øyet til pattedyr inneholder to anatomisk og funksjonelt ulike systemer for lysdetektering. Det ene er det klassiske visuelle system med staver og tapper som er ansvarlig for billedannelsen. Dette systemet gjør oss i stand til å se og følge objekter i den visuelle verden. Det andre er et såkalt ikke-billedannende (ikke-visuelt) system brukt for å detektere lysstyrke i omgivelsene. Dette ikke-billedannende systemet er ansvarlig for regulering av døgnrytmen, også kalt de cirkadianske rytmene, i kroppen ². I tillegg er systemet blant annet med på å regulere pupillestørrelsen.

De cirkadianske rytmene benyttes for å samstemme fysiologi og oppførsel på en måte som best mulig passer til tidspunktet på dagen. Cirkadianske rytmer finnes i organismer så ulike som dyr, planter, sopp og blågrønne alger. Blomster åpnes om morgenen og lukker seg om kvelden, mens mennesker plages av jet-lag fordi vi ikke raskt klarer å tilpasse oss nye tidssoner etter en flytur ³. Hos mennesker blir utskillelsen av kortisol, veksthormon og gonadotropiner styrt i forhold til de cirkadianske rytmene ⁴. En rekke fysiologiske

funksjoner som blodtrykk, våkenhet, stemningsleie, reaksjonstid og annet viser også rytmiske svingninger (se Figur 2 for en enkel fremstilling).

De cirkadianske klokkene er ikke nøyaktig tilpasset de 24 timene som døgnet har – derav navnet *cirka*/omtrent og *dies*/dag (fra latin) ⁵. De cirkadianske rytmene lages av nucleus suprachiasmaticus (NSC), som er en slags biologisk klokke som lager en bestemt rytme, uansett om den mottar ytre påvirkning eller ikke. Mennesker som blir isolert slik at de ikke får noen ytre signaler om lysforhold og tid på døgnet, men eksponeres for konstant svakt lys, utvikler en rytme med svingninger på ca 24,1 time ⁶. Uten informasjon om lys og mørke vil dette føre til at vår indre klokke og døgnrytmen i verden kommer helt ut av takt.



Figur 2: Oversikt over de cirkadianske rytmene hos mennesker. Figur hentet fra http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Biological_clock_human.PNG

Klokkene må synkroniseres med døgnrytmen for at indre og ytre tid samstemmer. Denne reguleringen gjøres hovedsaklig av fotoreseptorer som oppdager endringer i intensitet og kvalitet av lys over 24 timers syklusen, og sender informasjonen til nucleus suprachiasmaticus (NSC) i hypothalamus. Denne trakten fra øyet til NSC kalles tractus retinohypothalamicus, og ble beskrevet tidlig på 1970-tallet av Moore RY et al. Hva de enkelte bestanddelene av denne trakten besto av visste man imidlertid ikke ⁵.

Regulering av de cirkadianske rytmene krever lysstimulering med høy intensitet og lang varighet i forhold til hva som kreves for det bildedannende systemet. For eksempel krever det cirkadianske systemet i hamstre omtrent 100-200 ganger så stor lysintensitet enn det som kreves for et synsinntrykk. De cirkadianske rytmene reagerer dessuten lite på lysstimulering med varighet under 30 sekunder ⁵.

Utenom pattedyrene har andre virveldyr et stort spekter av fotoreseptorer for regulering av de cirkadianske rytmene, blant annet intracranielle pinealkjertler som er direkte lyssensitive, og egne fotoreseptorer dypt inne i hjernevevet.

Oppdagelsen av pRGC hos pattedyr

Man hadde tidligere vist at total enukleasjon av øynene førte til både visuell og ikke-visuell blindhet. Altså måtte de ansvarlige fotoreseptorene sitte i øynene 5. Lenge trodde man at stavene og tappene var nødvendig for både det bildedannende og det ikke-bildedannende systemet. I 1999 gjorde imidlertid Freedman et al forsøk på mus som var genetisk manipulerte slik at de manglet både funksjonelle staver og tapper (rd/rd/cl mus). Til tross for dette hadde musene tilnærmet normal evne til å regulere de cirkadianske rytmene ved hjelp av lyspåvirkning. Dette var det endelige beviset for at pattedyr har en tredje fotoreseptor i øyet ⁷.

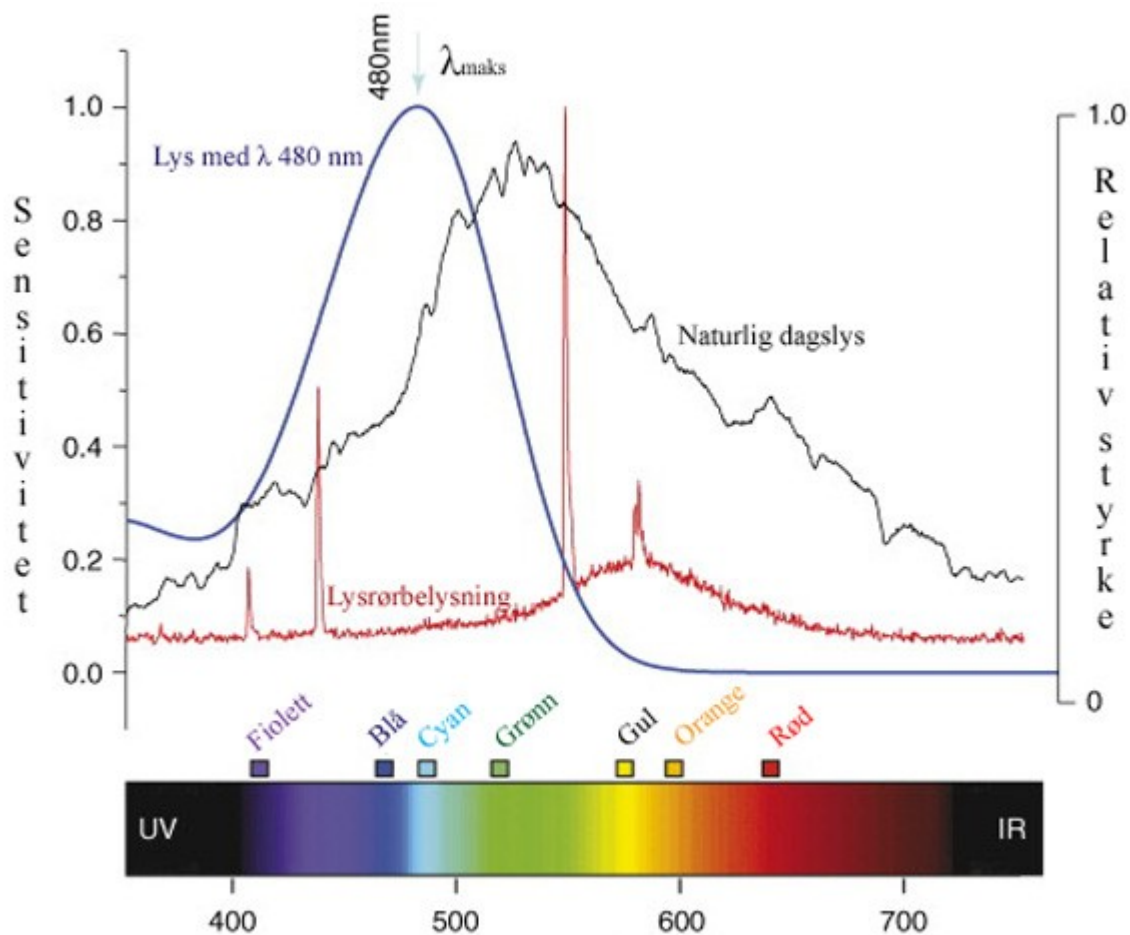
Rd/rd/cl mus modellen ble også brukt til å vise andre oppgaver for den nye ikke-stav, ikke-tapp fotoreseptoren hos pattedyr. Blant annet var pupillelysrefleksen inntakt hos disse musene uten funksjonelle staver og tapper, men med nedsatt sensitivitet. Dette antyder en komplisert samhandling mellom visuelle og ikke-visuelle fotoreseptorer i reguleringen av pupillestørrelsen. En hypotese er at det er en prosess i to stadier, der stavene og tappene tar seg av rask og svaklys pupillelysrefleksen, mens den ikke-visuelle reseptoren tar seg av den vedvarende og lysintensive pupillelysrefleksen ⁸.

Etter at den tredje fotoreseptoren i øyet til pattedyr var blitt påvist i 1999 startet jakten på hvor i øyet den befant seg. Det ble både forsket på mus og rotter. Hos rottene ble det injisert fluoriserende mikrosfærer inn i NSC, som så fulgte aksonene i tractus retinohypothalamicus til retinale gangliaceller som så ble merket. De merkede gangliacellene ble isolert og dissekert ut, men reagerte fortsatt på lys 5. Altså befinner den tredje fotoreseptoren i ganglielaget i det indre av retina, i motsetning til stavene og tappene som befinner seg i det ytre. Hos musene ble rd/rd/cl retinaer ladet med Ca²⁺-sensitivt fargestoff, som viste hvilke nevroner som reagerte på lys. Metoden viste at ca 3% av nevronene innen ganglielaget i retina reagerte. Ved å bruke carbenoxolone, som blokkerer gap-junctions, ble antallet ganglionceller som reagerte på lys redusert til ca 1 %. Dette viste at pRGC er koblet til ikke-fotosensitive gangliaceller via gap junctions 5.

Hos gnagere er antallet pRGC ca 1000-2000, som utgjør 1-3% av det totale antallet RGC ⁹. Hos aper er tallet ca 3000, som utgjør 0,2% av det totale antallet RGC. De fleste pRGC sitter i gangliacellelaget, mens noen sitter i det indre kjernelaget. pRGC har store og betydelig overlappende dendrittiske felt, som former et stort fotoreseptivt nett. De kan deles inn i to subpopulasjoner som sender sine dendritter til de ekstremt indre eller de ekstremt ytre grensene av det indre synapselag i retina ¹⁰.

Fotopigmentet melanopsin

Man visste nå hvilke celler i netthinnen som var direkte fotosensitive, og det neste naturlige skrittet var å identifisere hvilket fotopigment som pRGC benytter. De fotopigmentene som allerede var kjent i dyreverdenen består av et opsinprotein koblet til en spesiell form av vitamin A som kalles 11-cis retinal. Et kjennetegn ved alle slike fotopigmenter er at de har karakteristiske absorpsjonsprofiler når de blir belyst. Med andre ord kan det til hvert fotopigment settes opp en kurve som viser hvilke bølgelengder av lyset som absorberes best, et såkalt aksjonsspektrum (se Figur 3) 5



Figur 3: Aksjonsspektrum. Opsin med λ_{maks} 480 nm 5 (Oversatt til norsk).

Oppdagelsen av melanopsin

Det første fulle aksjonsspektrumet for fotopigmentet på pRGC ble funnet ved å teste pupille konstriksjon på rd/rd/cl mus. Dette viste at de hadde å gjøre med et tidligere ubeskrevet opsin/vitamin A-basert fotopigment med størst sensitivitet på bølgelengde 479 nm, som først fikk navnet OP⁴⁷⁹ (Opsin fotopigment med λ_{maks} 479 nm) 8. Andre forsøk på rotter, aper (macaque) og mennesker gir omtrent samme bilde, noe som tilsammen tilsier at den nye pRGC er ett enkelt opsin fotopigment med λ_{maks} på ca 480 nm. Se Tabell 3 for oversikt over funnene fra ulike forsøk. Det kan bemerkes at λ_{maks} for mennesker i flere av disse forsøkene er noe lavere, men dette skyldes antagelig varierte eksperimentelle prosedyrer, blant annet miljøet i de undersøkte vertscellene 5.

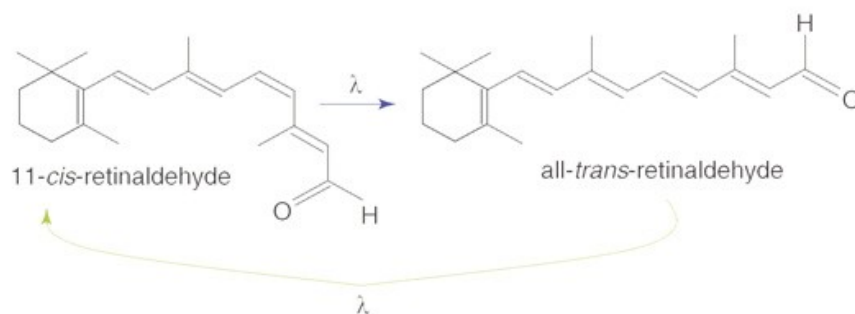
Art	Målemetode	λ_{maks}
Mus rd/cl	Pupillometri	479 nm
Mus rd/cl	Cirkadiansk faseforskyvning	481 nm
Rotte WT	pRGC lysrespons	484 nm
Macaque	pRGC lysrespons	482 nm
Macaque	Pupillometri	482 nm
Menneske	Melatonin hemming	446-477 nm
Menneske	Melatonin hemming	459 nm
Menneske	Regulering av tapp elektroretinogram	483 nm
Menneske	Heterolog ekspresjon	420-440 nm
Menneske	Heterolog ekspresjon	420 nm
Menneske	Heterolog ekspresjon	479 nm
Menneske	Heterolog ekspresjon	480 nm

Tabell 3: λ_{maks} verdier funnet i ulike forsøk 5.

Egenskaper til melanopsin

En ny oppdagelse viste at opsingenet melanopsin (offisielt kalt Opn4) uttrykkes innen en subpopulasjon av RGC som hadde mange likhetstrekk med de RGC som danner tractus retinohypothalamicus. Melanopsin "knockout-mus" (Opn4^{-/-}) ble undersøkt, og viste seg å ha redusert evne til regulering av den cirkadianske rytmen, redusert pupillekonstriksjon og mangel på direkte fotosensitivitet på pRGC. Når Opn4^{-/-} mus ble kryssset med rd/rd/cl mus, mistet de all respons på lys. Dette viser at staver, tapper og pRGC tilsammen står for all lysdeteksjon i øynene. I tillegg viser de med stor sannsynlighet at det er melanopsin som er fotopigmentet som brukes av pRGC 5.

Videre forskning viste at melanopsin alene var i stand til å sette i gang lyskaskaden som fører til G-proteinaktivering, som ender med depolarisering av cellen. For eksempel viste Melyan et al i 2005 at ved genekspressjon av melanopsin i neruroblastomceller (Neuro2A), sammen med 9-cis-retinal eller 11-cis-retinal, omgjorde de et ikke-fotosensitivt neuron til en funksjonell fotodetektor ¹¹. De samme studiene viste at melanopsin ser ut til å fungere som et bistabilt pigment, slik at det har evnen til å forme en stabil forbindelse med all-trans-retinal og til å regenerere dens eget pigment. De fungerer altså både som et fotopigment og fotoisomerase (se Figur 4) 9. Dette er en egenskap som er unik blant pattedyr, og minner om mekanismen for fotopigmenter hos virvelløse dyr. De har to fotokonvertible stabile tilstander, enten bundet til 11-cis-retinaldehyd eller all-trans-retinaldehyd. Dette er en nyttig egenskap ettersom pRGC sitter såpass langt unna senteret for retinoid resirkulering i pigmentepitelet i netthinnen, i motsetning til stavene og tappene som ligger tett inntil 11. Dessuten kan det være med på å forklare hvorfor melanopsin er mindre sårbar for pigmentdeprivasjon enn staver og tapper. Uansett er det en fordel at pRGC slipper å konkurrere med stavene og tappene om pigmentet 9.



Figur 4: Melanopsin er et bistabilt fotopigment. Blått lys endrer molekylet fra *cis*- til *trans*-form, mens mer langbølget gult lys endrer det tilbake til *cis*-formen 1.

En bemerkelsesverdig egenskap for melanopsin er dens evne til å integrere lysstimuli over flere minutter. Selv om det statistisk sett er liten sjanse for at et foton fanges opp av melanopsin, sett i forhold til staver og tapper, blir dette delvis kompensert for av en lang integrasjonstid. En vet ikke hvor i melanopsin signaliseringskaskaden denne mekanismen ligger 1.

En annen bemerkelsesverdig egenskap for melanopsin er at det blir overuttrykket relativt tidlig i utviklingen. Hos voksne mus uttrykker ca 1 % av gangliacellene melanopsin, men hos nyfødte mus uttrykker hele 10% av gangliacellene melanopsin, og er altså fotosensitive. Det har lenge vært allment antatt at mus i denne delen av sin utvikling har en retina som overhode ikke kan registrere lys. Disse pRGC projiserer til sentrale mål i hjernen, og sender informasjon om den ytre lysintensiteten til NSC som er under utvikling. Hva dette betyr for musene er uklart, ettersom mye tyder på at musenes cirkadianske rytmer bestemmes av morens melatonin, ikke av lys. En mulighet er at pRGC påvirker utviklingen av musenes visuelle system 1.

Genet for melanopsin ble først isolert fra melanoforer (pigmentceller i huden) hos frosker (*Xenopus*), derav navnet melanopsin. Det viste seg at dette opsinet genetisk sett hadde større likehetstrekk med opsiner hos virvelløse dyr, for eksempel med rhodopsinet til blekkspruter, enn med de klassiske visuelle pigmentene. Evolusjonsmessig tyder dette på at melanopsingenfamilien har fulgt en annen linje enn stavene, tappene, pineal og VA-opsin fotopigmentene ¹².

Flere viktige egenskaper skiller altså melanopsin fra de andre fotopigmentene hos pattedyr ^{1 og 9}:

- Lys depolariserer pRGC, men hyperpolariserer staver og tapper.
- pRGC er langt mindre sensitive for lys enn staver og tapper.
- Kinetikken for lysresponsen hos pRGC er omtrent 100-200 ganger saktere enn responsen hos staver og tapper. Maksimal respons hos pRGC oppnås etter 30 sekunder til 1 minutt stimulering.
- pRGC har evnen til å integrere lysstimuli slik at de fyrer aksjonspotensialer så lenge lysstimulene varer. Dette gir hjernen informasjon om den vedvarende lystilstanden i det ytre miljøet som er nødvendig for regulering av de cirkadianske rytmene.
- Melanopsin uttrykkes på relativt mange RGC tidlig i utviklingen hos mus. Disse fotoreseptorene fungerer allerede ved fødselen, i motsetning til staver og tapper.

Spennende funn hos mennesker

Nylig studerte Zaidi et. al. en rekke ikke-visuelle fotoresponser hos to pasienter som var visuelt blinde på grunn av degenerasjon av staver og tapper. Begge individene hadde intakt cirkadiansk rytmereguleringsfunksjon i forhold til stimulering av lys-mørke. Det ble målt ved hjelp av aktigraf, et ikke-invasiv målerinstrument som kontinuerlig registrerer motorisk aktivitetsnivå. Hos den første pasienten, en 56 år gammel mann, ble reguleringen av de cirkadianske rytmene bekreftet med døgkontinuerlig monitorering av melatoninnivået. Her ble det målt betydelig hemming av serum melatonin ved lysstimulering om natten. Hos den andre pasienten, en 87 år gammel kvinne, ble pupillelysrefleks målt i forhold til ulike monokromatiske (ensfarget lys, altså én bølgelengde) lysstimuli. Dette ga et aksjonsspektrum som tydelig passet til melanopsin. Tilsammen viste disse forsøkene at det også hos mennesker er pRGC som gjennom melanopsin formidler informasjon om lysintensiteten i omgivelsene til NSC for å regulere de cirkadianske rytmenene ¹³.

Likevel er et av de mest spennende aspektene med de nye funnene til Zaidi et al. at de også viser at andre sider ved vår fysiologi og oppførsel blir påvirket av det ikke-visuelle systemet. Det første individet som ble undersøkt viste økt alfa-bølge elektroencefalogram (EEG) aktivitet i løpet av våkenperioden, noe som en mener kan være et tegn på økt årvåkenhet, mens han ble belyst med blått lys. Potensielt kan disse undersøkelsene innebære en bemerkelsesverdig konklusjon; Blått lys kan påvirke vår årvåkenhet. Tilleggsdata fra denne pasienten viste at hørselsreaksjoner og subjektiv tretthetsfølelse var forskjellige under eksponering fra blått og grønt lys ¹³.

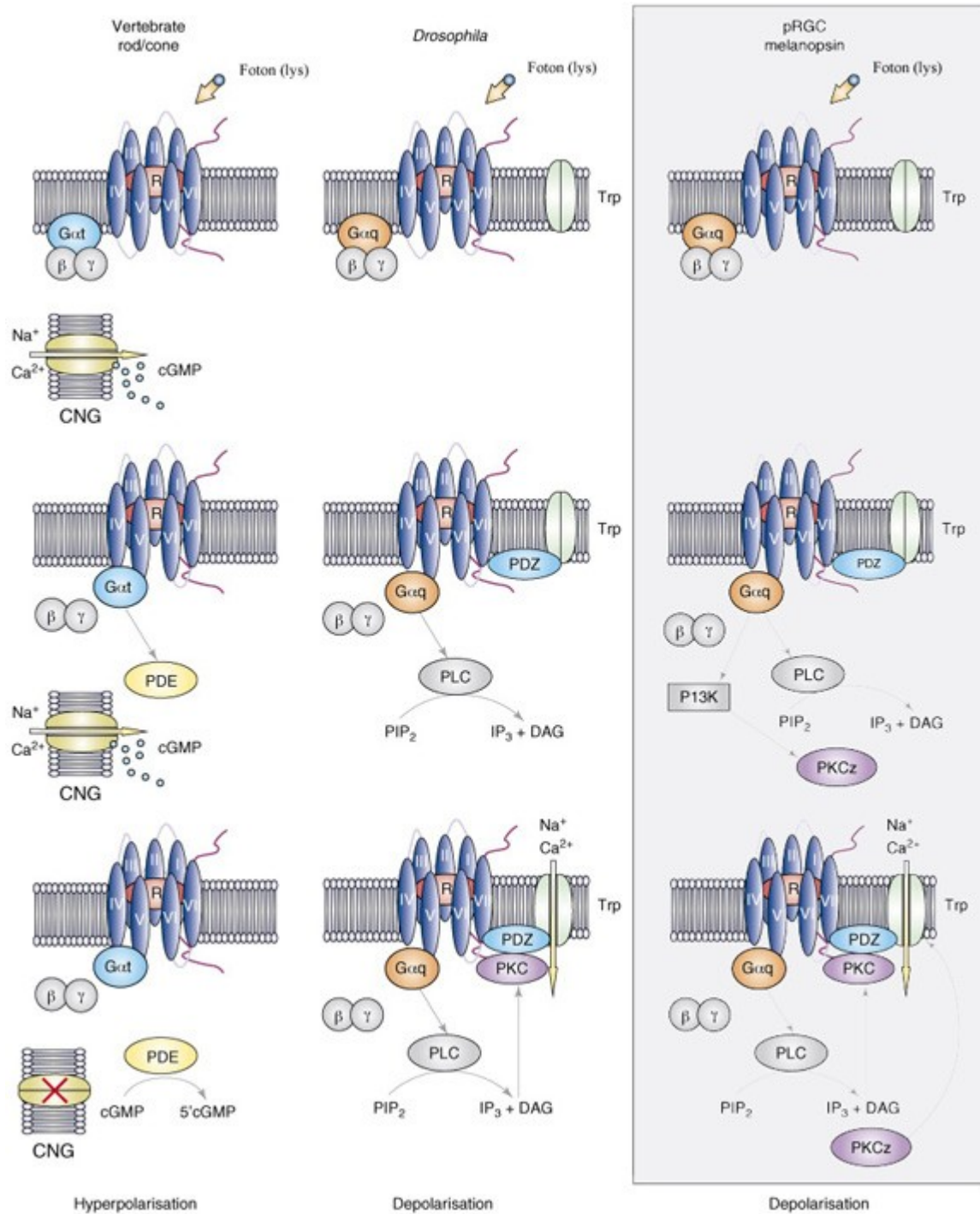
Det andre individet ble spurt om å prøve å angi når hun ble eksponert for lys, selv om hun ikke hadde noen bevisst lyssans. Det klarte hun tilsynelatende når hun ble eksponert for lys med bølgelengde 480nm. Dette kan bety, på samme måte som den økte årvåkenheten ved eksponering for blått lys, at vår oppførsel ubevisst kan bli påvirket av det ikke-visuelle systemet 13.

Et tilsvarende fenomen kalt "blindesyn" har vært dokumentert hos mennesker med total kortikal blindhet, men som antageligvis har de ikke-visuelle subkortikale banene intakt. Disse viser seg å ha evnen til å være bevisste på gjenstander de ikke kan se. Selv om både årvåkenhets og bevissthetsforsøkene må gjentas og undersøkes nøyere hos flere blinde mennesker, viser disse første resultatene at det ikke-visuelle systemet har allsidige underbevisste funksjoner hos mennesker 14.

Førsøkene har også klinisk betydning. Vinterdepresjoner har vist seg å respondere på behandling med lysterapi, særlig med blått lys. Målcellen for denne terapiformen kan derfor være pRGC. Pasienter med øyesykdommer som sannsynligvis omfatter pRGC, som glaukom, kan derfor ha større risiko for psykiatriske og cirkadianske søvnproblemer enn pasienter som er blinde av andre årsaker, noe som blant annet har blitt vist i studier med blinde barn. Dersom resultatene som viser at årvåkenhet og kognitive funksjoner blir påvirket av det ikke-visuelle systemet blir bekreftet i større studier, viser dette at øyets helse kan påvirke vår mentale helse og funksjon i langt større grad enn tidligere antatt ¹⁴.

Fototransduksjon

Oppbyggingen av melanopsin indikerer at det har sterke likhetstrekk med hvordan fotoreseptorene hos virvelløse dyr omdanner lys til nervesignal, såkalt fototransduksjon. Hos fluearten *Drosophila* skjer fototransduksjon ved at den rhambdomeriske fotoreseptoren aktiverer et G_q/G_{11} -type G protein, deretter aktivering av fosfolipase C (PLC) og åpning av transiente reseptorpotensialkanaler (TRPC) som resulterer i depolarisering av cellemembranen. Dette er svært forskjellig fra hvordan fototransduksjon foregår i opsinene til staver og tapper. Der aktiveres transducin ($G_{t/o}$), deretter fosfodiesterase, hydrolyse av cGMP, lukking av syklisk nukleotid-styrte kanaler (cyclic nucleotide gated channel) som resulterer i hyperpolarisering av plasmamembranen 5. Se Figur 5 for en oversikt.



Figur 5: Fototransduksjonskaskade. Sammenligning mellom kaskaden med staver/tapper, hos virvelløse *Drosophila* og for pRGC 5.

Når det gjelder melanopsin fototransduksjon er det fortsatt mye vi ikke vet. Det er imidlertid bred enighet om at melanopsin benytter et G-protein koblet system, og mye tyder på at det benytter et system som ligner det rhambdomeriske med G_q/G₁₁-type G protein, PLC og TRPC kanal ¹⁵. Det kan likevel ikke utelukkes at det foregår flere

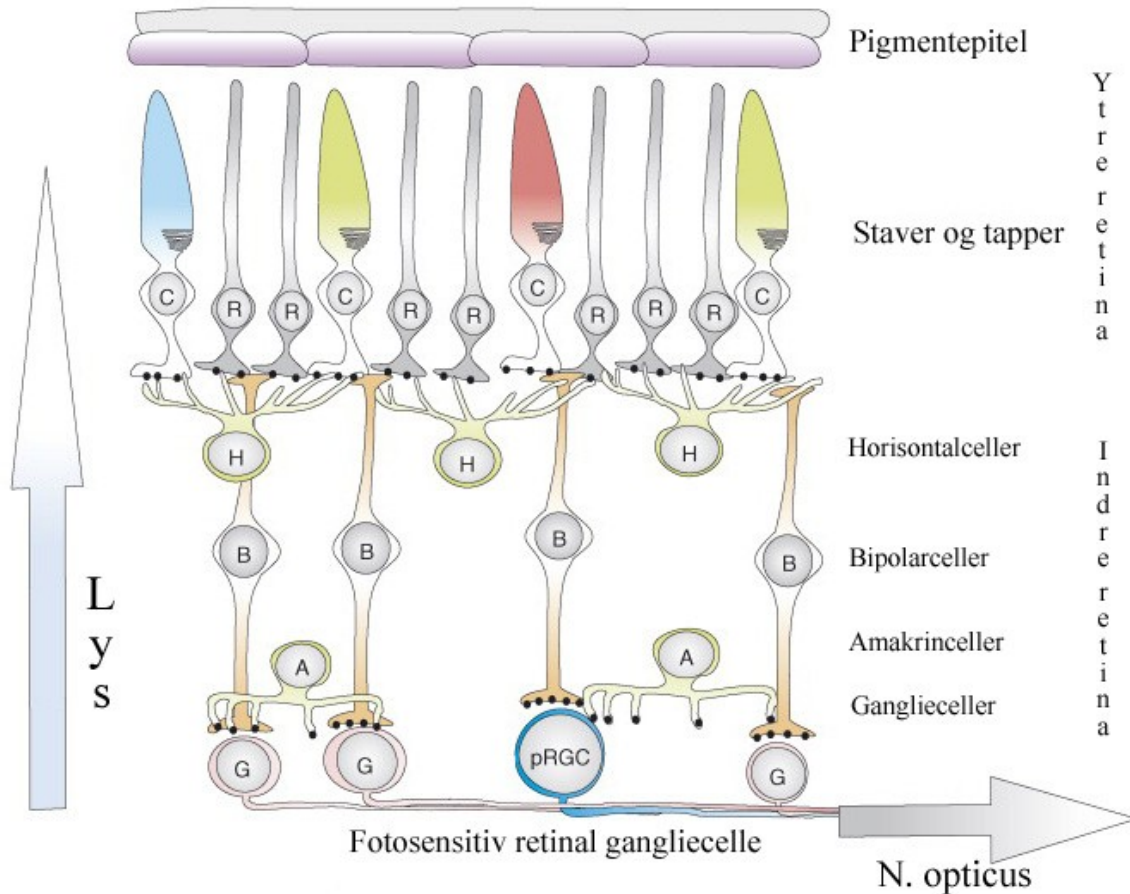
parallele transduksjonskaskader som til en viss grad overlapper hverandre. Figur 5 viser en arbeidsmodell for melanopsin fototransduksjon. Den viser at lysaktivert melanopsin aktiverer G_q/G_{11} som i sin tur aktiverer PLC- β . Deretter genereres IP3 og diacylglycerol (DAG) som åpner en TRPC (sannsynligvis TRPC6 eller TRPC7), muligens via et protein kinase C (PKC) 5. Denne arbeidsmodellen støttes av undersøkelser med mikromatriser, som benytter rd/rd/cl mus og viser at omtrent 30% av de okulære transkriptene midlertidig reguleres som følge av eksponering for lys om natten. Fra et utvalg av genene viste laserfanget mikrodiseksjon at *Gnas*, *Gnb211*, *Gnaq*, *Prkcz*, *Pik3r1*, *Inadl*, *Slc9a3r1* og *Drd1a* kolokaliserte med melanopsin. Ved bruk av mus der *Prkcz* (protein kinase C zeta) var fjernet (*Prkcz*^{-/-}) så man at de viste samme fenotyp som mus der melanopsin var fjernet (*Opn4*^{-/-}), altså nedsatt evne til regulering av den sirkadianske rytmen, redusert pupillekonstriksjon samt svekket lysindusert genekspressjon i NSC. Altså er dette genet kritisk for melanopsinsignalliseringen, og er muligens med på å regulere TRPC aktivitet eller en annen kritisk bit av transduksjonskaskaden ¹⁶.

Samarbeid mellom staver, tapper og pRGC

Forsøkene på rd/rd/cl mus viste at staver og tapper ikke er nødvendige for regulering av de sirkadianske rytmene, samt pupillekonstriksjon 7. Likevel betyr ikke dette at staver og tapper ikke spiller noen rolle for disse funksjonene. Tvert imot viser studiene på *Opn4*^{-/-} mus at sirkadiansk rytmeregulering til en viss grad fortsatt fungerer. Altså kan staver og tapper delvis kompensere for mangel på melanopsin, mens mangel på staver og tapper helt kan kompenseres med pRGC i det ikke-visuelle systemet.

Forskning på aper (macaque) har vist at tapper som reagerer på korte bølgelengder (λ_{maks} 435nm) demper lysresponsen i pRGC, mens stavene og tapper som reagerer på middels (λ_{maks} 530nm) og lange (λ_{maks} 560nm) bølgelengder bidrar eksitatorisk på pRGC. Forklaringen på denne interaksjonen er ikke kjent, men har sannsynligvis med den komplekse oppgaven å registrere skumring, samt øynenes adaptive respons på ytre lysforhold som sakte forandrer seg 10. Nylig viste et studie at hos mus helt uten pRGC i retina mistet pupille-lysrefleksen. Dette betyr at selv om staver og tapper til en viss grad kan kompensere for mangel på fotopigmentet melanopsin, så er pRGC nødvendige for å videreformidle informasjonen om lysstimuli videre til hjerneavsnittene ansvarlige for pupillereaksjonene. De samme forsøkene viste at bare 17% av vanlig antall pRGC er nødvendig for full pupillekonstriksjon ¹⁷.

Den mest opplagte kilde for påvirkning fra staver og tapper er gjennom synapser fra amakrinceller og bipolarceller i retina (se Figur 6) 9. Man mener derfor at arbeidsfordelingen er at staver og tapper bidrar med tidlig sensitivitet og hurtighet for lyssignalisering for de ikke-visuelle funksjonene, mens pRGC bidrar med vedvarende signaler gjennom hele lysstimuleringens varighet 10. Imidlertid er det spesifikke samspillet mellom staver, tapper og pRGC fortsatt uavklart 5.



Figur 6: Lysdeteksjon i retina hos mennesker 5.

Overføring til NSC og projeksjoner til andre hjerneavsnitt

Tractus retinohypothalamicus er en monosynaptisk trakt som forbinder pRGC med NSC. Depolarisering av pRGC fører altså til et aksjonspotensial som overføres direkte til NSC. Tractus retinohypothalamicus benytter glutamat som sin viktigste neurotransmitter, men frigjør også hypofyse adenyl cyclase-aktiverende peptid (PACAP) som en ko-transmitter. 6.

pRGC innnerverer også en rekke andre hjerneregioner. Projeksjonene ble godt visualisert i en muserekke som hadde melanopsinkoblet tau-lacZ markeringsgen, som koder for β -galactosidase koblet til en tau-protein-sekvens for lokalisering av aksoner. Den blå merkingen av β -galactosidase aktivitet ga et levende bilde av de individuelle aksonene hos denne musen. Andre teknikker ble også brukt slik at forskerne fant at flertallet av pRGC innnerverer NSC, og at de fleste av RGC som innnerverer NSC var pRGC. Projeksjoner fra pRGC blir også sendt til IGL (intergeniculate leaflet) i thalamus, der visuell og ikke-visuell informasjon integreres for å regulere de sirkadianske rytmen, og til nucleus olivaris pretectalis som kontrollerer pupille-lysrefleksen.

Andre hjerneområder som mottar fibre fra pRGC, men som i større grad innerveres av RGC som ikke er fotosensitive, omfatter nucleus preopticus ventrolateralis som er med på søvnregulering hos pattedyr, hypothalamus lateralis, som er med på energihomeostasen og zona subparaventriculare ventralis, som er med på regulering av cirkadianske rytmer og akutt demping av motorisk aktivitet 9. Det at pRGC hos aper også projiserer til nucleus geniculatum laterale, som er reléstasjonen i thalamus for visuell informasjon til synsbarken, tyder på at disse cellene også bidrar til bevisst visuell persepsjon 10.

pRGC mål	For-kortelse	Funksjon til mål	Innvering	Arter undersøkt
nucleus suprachiasmaticus	NSC	Ansvarlig for cirkadianske rytmer	Dominant	Mus, rotte, hamster
intergeniculate leaflet	IGL	Integrere cirkadiansk informasjon (lys og annet)	Stor andel	Mus, rotte, hamster
nucleus olivaris pretectalis	NOP	Kontrollerer pupille lysreflekse	Stor andel	Mus, rotte, hamster, macaque
habenula lateralis	HbL	Integrasjon limbisk, motorisk og cirkadiansk info	Usikkert	Mus
nucleus geniculatus dorsolateralis	NGdL	Bildeformende syn	Liten andel	Mus, macaque
hypothalamus lateralis	HL	Energhomeostasen	Liten andel	Mus, rotte
nucleus posterolateralis thalami	NpLT	Høyereordens prosessering av thalamiske, kortikale og visuelle signaler	Liten andel	Mus, rotte
nucleus posterolimitans thalami	NpLiT	Oppdager raske lysforandringer for ikke-visuelt system	Moderat andel	Rotte
colliculus superior	SC	Styring av øyebevegelser	Liten andel	Mus, rotte, hamster
nucleus geniculatus ventrolateralis	NGvL	Visuomotor funksjon	Liten andel	Mus, rotte
zona subparaventriculare ventralis	ZSPV	Cirkadiansk og direkte regulering av motorisk aktivitet og søvn	Liten andel	Rotte
nucleus preopticus ventrolateralis	NPOvL	Søvnregulering	Liten andel	Mus, rotte

Tabell 4: Proeksjoner pRGC. Innvering viser andel i forhold til ikke fotosensitive RGC 9.

Nylig ble det vist at det hos mus finnes to subtyper av melanopsin, M1 og M2. Betydningen av dette er ukjent, men en så at de to subtypene til en viss grad projiserer til ulike hjerneavsnitt. 80% av pRGC som projiserer til NSC er av type M1, mens de resterende 20% er av type M2. 100% av pRGC som projiserer til colliculus superior (blant annet ansvarlig for raske øyebevegelser og koordinasjon øye-hode) er av type M1. 45% av pRGC som innnerverer nucleus olivaris pretectalis er av type M1, mens 55% er type M2. Den fullstendige funksjonelle betydningen av de mange pRGC projeksjonene, samt forskjellen på de to subtypene av melanopsin gjenstår å finne ut ¹⁸.

Nucleus suprachiasmaticus

Kroppens hovedklokke som styrer de cirkadianske rytmene sitter i nucleus suprachiasmaticus (NSC) i hypothalamus. NSC er en parret struktur som hver inneholder ca 10.000 nerveceller med noe ulike egenskaper.

Rytme genereringen i NSC

Et av de tidlige spørsmålene som ble stilt da en prøvde å skjønne hvordan rytme genereringen foregår i NSC var om mekanismen ble styrt fra enkeltceller eller om det skyldtes interaksjoner mellom mange nevroner. Det var en kjent sak at cellene dannet lokale nettverk, noe som talte til fordel for nettverkshypotesen. Enkeltceller fra NSC hos neonatale rotter ble derfor kultivert og undersøkt med tanke på rytme generering. Det viste seg at selv om all elektrisk aktivitet mellom cellene ble blokkert, opprettholdt enkeltcellene cirkadianske rytmer. Siden har studier vist at NSC er bygget opp av to grupper nevroner; en "kjernegruppe" og en omkringliggende "skjellgruppe". De rytme genererende nevronene finnes i skjellgruppen, mens man i kjernen finner ikke-rytme genererende nevroner som reagerer på lys. Områdene er kraftig forbundet med hverandre 6.

Fra 1970-tallet viste studier på sopp (neurospora) og fluer (drosophila) at cirkadiansk rytme generering var under genetisk kontroll. Hos pattedyr kom gjennombruddet først i 1997, da tre klokkegener (*clock*, *B-mal* og *per*) ble funnet. Senere har mange andre klokkegener også blitt oppdaget. De har store likheter, både i sekvens og mekanisme, som klokkegenene funnet hos sopp og fluer. De cirkadianske rytmer reguleres både i transkripsjonen, translasjonen og i post-translasjonen av klokkegenene. For eksempel er genet *clock* kritisk for å bestemme perioden i den cirkadianske rytmen for individuelle NSC nevroner 6.

De cirkadianske rytmene genereres kort sagt av koblete tilbakemeldingssløyfer der "klokke-protein" transkripsjonsfaktorer har en negativ regulerings effekt på ekspresjonen av "klokke-genene" som koder for dem 3. Sagt litt enklere er det visse selv-startende gener inne i kjernen av NSC nevronene som setter i gang syntesen av klokkeproteiner i cytosol som omslutter kjernen. Ettersom dagen går fortsetter disse klokkegenene å akkumulere inntil de til slutt når en kritisk masse, noe som fører til at de transporteres tilbake til kjernen. Her blokkerer de den genetiske prosessen som er ansvarlig for deres egen produksjon. Nivået av klokkeproteiner minsker gradvis på grunn av degradering i kjernen, noe som fjerner deres inhiberende virkning på det genetiske klokkeprotein

maskineriet. Når blokkeringen er opphevet kan genene nok en gang begynne å produsere klokkeproteiner, og syklusen starter på nytt. Hver syklus tar omtrent 24 timer. Det er de varierende nivåene av klokkeproteiner som fører til de sykliske forandringer i nervesignalene som sendes ut fra NSC, og er grunnlaget for de cirkadianske rutnene ¹⁹.

Faktorer som kan føre til faseforskyvninger i NSC

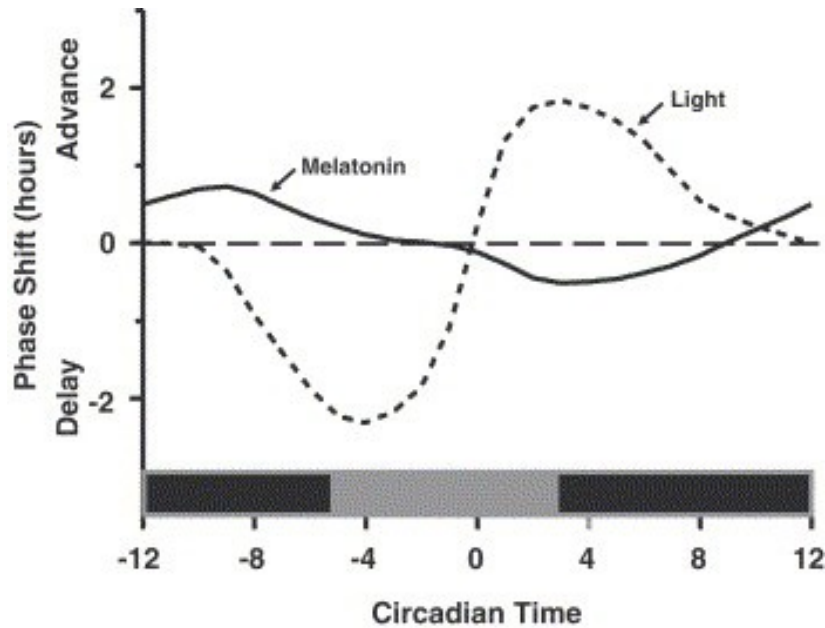
Den viktigste faktoren for å regulere de cirkadianske rytmen er lys. Ellers har både melatonin og fysisk aktivitet vist seg å kunne føre til faseforskyvning i NSC.

Det er blitt vist at eksogent glutamat endrer fyringsraten i NSC nevner. Fase-respons kurven for glutamat er identisk til fase-responskurven for lys hos levende dyr. Glutamat fører til en faseforsinkelse når det gis tidlig om natten, og en fasefremskynding når det gis sent på natten, mens det ikke gir faseforskyvning når det gis i løpet av dagen. Effektene av glutamat, og antagelig tilsvarende effekten for lys, blir trolig mediert av aktivisering av NMDA-type glutamat reseptorer, deretter økning av intracellulær Ca^{2+} og nitrogenmonoksid (NO) i nevnerne i NSC 6.

Andre endogene stoffer som kan bidra til faseforskyvning i NSC er melatonin, dopamin, acetylcholin, neuropeptid Y og PACAP (ko-transmitteren i tractus retinohypothalamicus). Hver av disse nevrotransmittere/nevrohormonene kan endre NSC rytmer in vitro og det antas at de også er med på regulering av NSC in vivo. I tillegg til glutamat, kan PACAP også faseforskyve rytmen i NSC på en tilsvarende måte som lys, noe som tyder på at PACAP er involvert i lysreguleringen av NSC 6.

Fra pRGC projiseres nervefibre som inneholder PACAP til IGL, som i sin tur sender projeksjoner til NSC. Den sistnevnte projeksjonen benytter GABA og neuropeptid Y som kotransmittere. Eksogent neuropeptid Y eller stimulering av IGL fører til faseforskyvning i NSC. Skader i IGL hos mus fører til at den uregulerte rytmen i NSC forlenges. Noen undersøkelser antyder at IGL kan bidra til faseforskyvning i NSC ved fysisk aktivitet. Denne banen er et av flere eksempler på de mange potensielle måtene som rytme generatoren i NSC kan reguleres fra andre sentre i sentralnervesystemet 6.

Blant de mange nevrotransmitterne som kan påvirke rytmen i NSC er melatonin spesielt interessant. Dette skyldes både at melatonin er nært knyttet til søvn-reguleringen, og fordi det enkelt kan benyttes farmakologisk. Administrering av eksogent melatonin hos mennesker har ulik effekt avhengig av tidspunktet på døgnet det gis. Dersom melatonin gis tidlig på kvelden får man en fasefremskynding, det vil si at de cirkadianske rytmen forkortes, og man blir trett tidligere enn vanlig. Administrering tidlig på morgenen fører til en faseforsinkelse av rytmen, mens administrering midt på natten ikke har noen effekt. Administrering av melatonin har altså motsatt effekt av lys. Sterk lyspåvirkning om kvelden forsinker rytmen, mens sterkt lys om morgenen gjør at rytmen forkortes. Sterkt lys midt på dagen har ingen effekt 6. (Se Figur 7.)



Figur 7: Fase-responskurve for melatonin og lys. Tid 0 viser midt på natten (lavest kjernetemperatur). Lyseksponering før tid 0 fører til faseforsinkelse av rytmen, mens lyseksponering etter tid 0 fører til fasefremskynding. Omvendt effekt av melatonin. 6.

Effekten av melatonin på de cirkadianske rytmene skyldes antagelig melatoninets direkte effekt på nevronene i NSC. McArthur et al. så i 1991 på effekten av melatonin på NSC i skivepreparater av hypothalamus. De viste at melatonin forkortet de cirkadianske rytmene når det ble påført skivepreparatene ved solnedgang. Melatonin hadde liten effekt når det ble påført i løpet av andre tider på døgnet ²⁰. Fase-responskurven for melatonin (se Figur 7) viser at NSC bare er sensitiv for melatoninets, lysets og andre stoffers faseskiftende effekter under spesifikke faser av den cirkadianske rytmen. Det cellulære grunnlaget for denne effekten er ikke forstått, og antas å være kompleks. Det man vet er at antallet melatoninreseptorer i NSC varierer gjennom døgnet. Antallet er lavest om dagen og høyest om natten, samtidig som melatoninsekresjonen er størst. Ekspresjon av melatoninreseptorene i nevronene i NSC styres av samme klokke som styrer de cirkadianske rytmene 6.

Melatonin fører til en akutt hemning av den elektriske aktiviteten i nevronene i NSC, i tillegg til faseforskyving av de cirkadianske rytmene. Det viser seg at nevronene i NSC har to ulike melatoninreseptorer, MT_1 og MT_2 , som har hver sin rolle. Det man tidligere trodde var en tredje type melatoninreseptor, MT_3 , viste seg å være et enzym (quinon reduktase 2) ²¹. Liu et al. brukte i 1997 transgene mus som manglet ekspresjonen av MT_1 for å sammenligne rollene til MT_1 og MT_2 . Ved tilførsel av melatonin hos disse musene skjedde det ikke noen akutt hemning av den elektriske aktiviteten i nevronene i NSC, mens faseforskyvningen skjedde på vanlig måte. I et annet studium av Jin et al. ble det i 2003 brukt transgene dyr som manglet ekspresjon av MT_2 . Hos disse dyrene skjedde den akutte elektriske hemningen på vanlig måte ved tilførsel av melatonin, men dyrene viste ingen tydelig cirkadiansk rytmeaktivitet. Dette var uventet. Man kunne vente at mangel på MT_2 ville føre til mangel på regulering av de cirkadianske rytmene, men at dyrene

skulle vise mangel på selve de cirkadianske rytmene stemte dårlig med forsøk der dyr, inklusive mennesker, fortsetter å vise cirkadianske rytmer selv om de ikke har evnen til å syntetisere melatonin 6.

Signaler ut fra NSC

Nevroner i NSC benytter GABA som primær nevrotransmitter. De skiller også ut antidiuretisk hormon (ADH) på en måte som varierer med de cirkadianske rytmene. Det er disse to budbringerne som overfører de cirkadianske rytmene til nærliggende strukturer i hypothalamus og til andre deler av hjernen. De viktigste projeksjonen fra NSC er lokale kretser innad i NSC, forbindelser med andre kjerner i hypothalamus, den basale forhjern, og midtlinjen av thalamus. Andre projeksjoner omfatter strukturer involvert i melatonin sekresjon, autonom regulering, oppmerksomhet, fysiologiske ferdigheter, regulering av søvn-syklus og andre funksjoner.

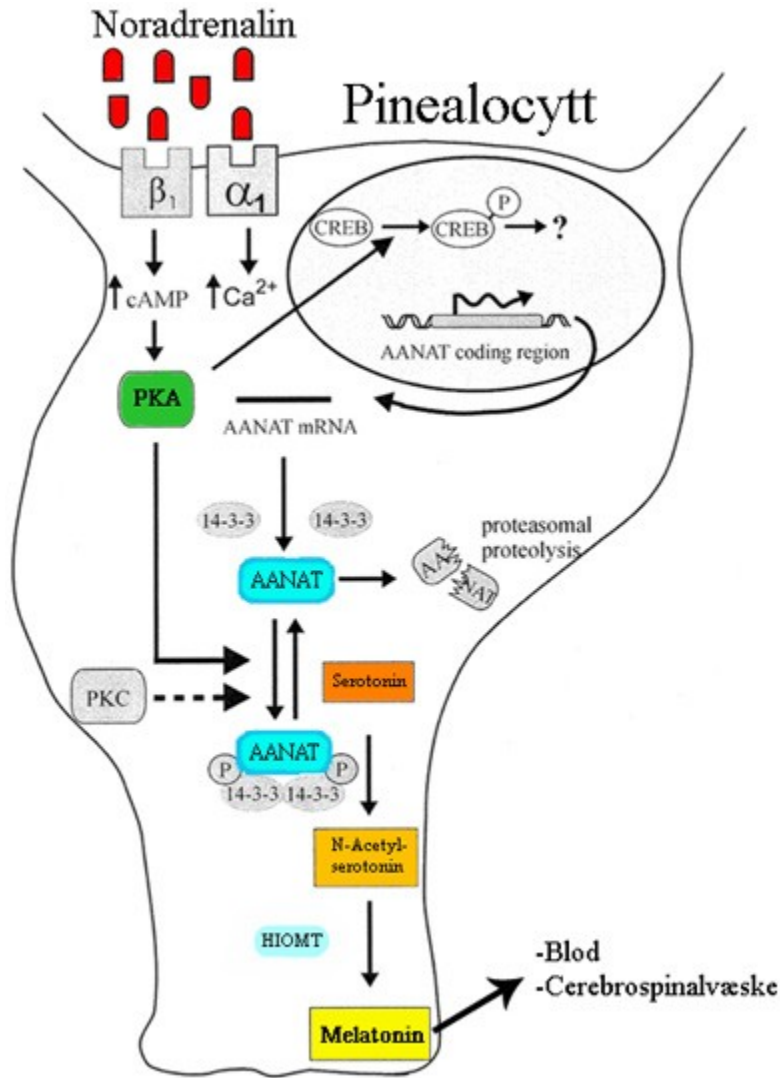
Melatonin syntese kontrolleres av de cirkadianske rytmene. Denne kontrollen skjer via kompliserte, indirekte baner fra NSC til corpus pineale 6. Disse banene involverer nucleus paraventricularis i hypothalamus, den intermediolaterale cellesøyle (sidehornet) i ryggmargen, og ganglion cervicale superius som sender sympatiske fibre til pinealkjertlen ²².

Pinealkjertlen

Pinealkjertlen er en liten, kongleformet struktur som sitter i midtlinjen på toppen av diencephalon, i taket av 3. ventrikkel. Den kalles også epifysen, corpus pineale eller konglekjertlen. Ingen nervefibre går ut av pinealkjertlen, og den regnes som en endokrin kjertel. Kjertelcellene, kalt pinealocytter, produserer hormonet melatonin.

Melatoninisyntese

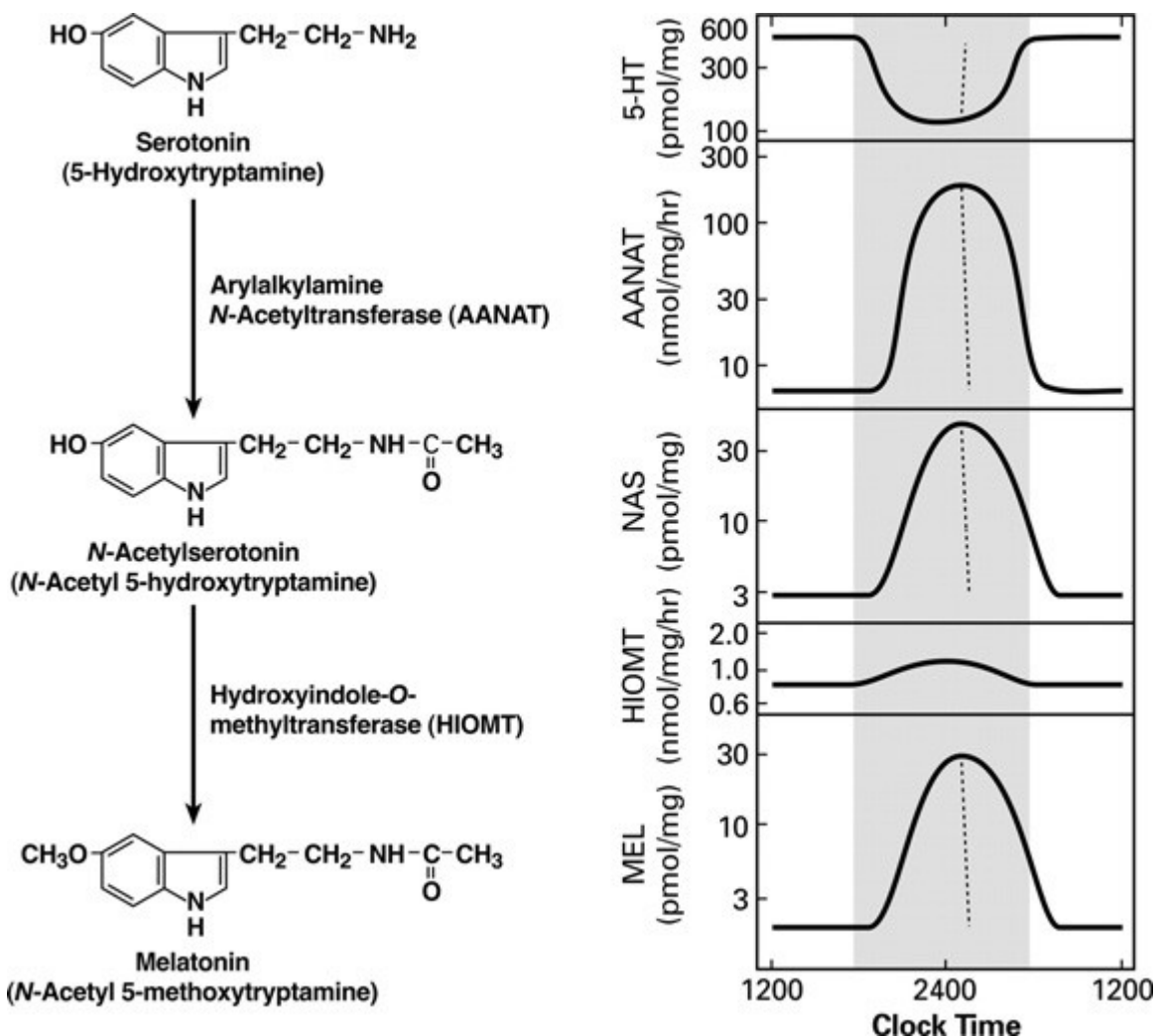
Kilden til melatonenproduksjon er aminosyren tryptofan. Det omdannes til serotonin, som metaboliseres til melatonin gjennom to trinn, katalysert ved hjelp av arylalkylamin N-acetyltransferase (AANAT) og hydrokxyindo-O-metyltransferase (HIOMT). ²³.



Figur 8: Melatoninsyntesen i pinealocyten hos kuer 23.

Melatoninsyntesen styres av NSC. Den siste delen av banen mellom NSC og pinealkjertlen er den sympatiske banen fra ganglion cervicale superius, der noradrenalin benyttes som neurotransmitter i synapsen mot pinealkjertlen. Noradrenalin bindes hovedsaklig til β_1 -adrenerge reseptorer, noe som fører til at nivået av cAMP intracellulært øker i pinealocyttene om natten. Denne økningen av cAMP potensieres av samtidig aktivisering av α_1 -adrenerge reseptorer gjennom en calciumavhengig mekanisme. Amplituden av cAMP responsen varierer veldig mellom arter, fra 2 ganger hos kuer til 100 ganger hos rotter. Økt cAMP nivå stimulerer protein kinase A (PKA), som katalyserer fosforylering av AANAT. Dette enzymet spiller en avgjørende rolle i det rytmiske systemet for melatoninproduksjonen. AANATs aktivitet øker 10- til 100-ganger om natten, noe som øker produksjonen av melatoninforløperen N-acetylserotonin. Påfølgende metylering av N-acetylserotonin ved hjelp av HIOMT, er det endelige trinnet i produksjonen av melatonin (eller N-acetyl-5-metoksytryptamin). Se Figur 8. Ettersom

AANAT er flaskehalsen i denne kaskaden, blir det ansett som regulatoren, og har derfor fått kallenavnet "the timezyme" (se Figur 9) ²⁴.



Figur 9: Daglige rytmer i den pineale indolaminmetabolismen. Det skyggelagte feltet representerer tiden på døgnet når det er mørkt. økningen i AANAT aktivitet med påfølgende endringer i melatoninsyntesen skjer normalt om natten 24.

Regulering av melatoninsyntesen

Likevektstilstanden til AANAT proteinet følger av balansen mellom syntese og degradering. Fosforyleringen av AANAT beskytter proteinet mot degradering, samtidig som det øker affiniteten for serotonin. Fosforyleringen er imidlertid reversibel, og ubeskyttet AANAT blir raskt brutt ned. cAMP er hos noen arter også i stand til å kontrollere ekspresjonen av AANAT, men dette gjelder ikke mennesker, der AANAT blir uttrykt i en relativt konstant mengde ²².

Dynamikken i reguleringen av AANAT er bemerkelsesverdig. Oppreguleringen om natten har en doblingstid på omtrent 15 minutter, mens nedreguleringen som følge av lysstimulering har en halveringstid på omtrent 3,5 minutter. Melatoninnivået i blodet følger disse forandringene tett på grunn av rask nedbrytning i leveren 24. Dermed følger melatoninsyntesen de cirkadianske rytmene. Imidlertid at corpus pineale avhengig av signalene fra NSC, da en skade i NSC eller langs den sympatiske grensestreng fører til at melatoninproduksjonen stopper opp ²⁵.

Nedregulering av AANAT er en rask prosess som følge av lysstimulering med påfølgende hemmet frigjøring av noradrenalin ved de sympatiske nerveendene. Imidlertid reduseres melatoninproduksjonen før det blir lyst, noe som tyder på en eller flere andre hemmende faktorer spiller en rolle sent på natten. Disse faktorene er ikke kjent, men kan skyldes redusert cAMP som følge av at de membranbundede adrenerge reseptorene på pinealocyttene blir mindre sensitive for noradrenalin, eventuelt at degraderingsraten til cAMP øker, utover natten 22.

Melatonin

Melatonin er et hormon som ble først identifisert i 1958 av Aaron Lerner. Han prøvde hormonet på seg selv, og rapporterte at det gjorde han søvnig ²⁶. Produksjonen av melatonin skjer hovedsaklig i pinealkjertlen, men også i øyet (retina, linsen og corpus ciliare, tårekjertlen 4), huden, mage-tarm kanalen, beinmargceller og lymfocytter ²⁷. Det er et svært lipofilt molekyl som skilles ut i blodet og cerebrospinalvæsken øyeblikkelig etter syntesen i pinealkjertlen 22. Det lagres altså ikke i pinealocyttene, så det er synteseraten som bestemmer plasmakonsentrasjonen. Sekresjonen skjer hovedsaklig mens det er mørkt, og kalles gjerne for ”mørkehormonet”. Hos mennesker følger plasmakonsentrasjonen de cirkadianske rytmene på samme måte som kjerne kroppstemperaturen. Den laveste kjernetemperaturen kommer rett etter at plasmakonsentrasjonen av melatonin er på topp 6.

Melatonin ble gitt sitt navn på grunn av dens ”melanin granula aggregerende” effekt. Det er et eldgammelt molekyl som finnes i organismer så enkle som prokaryoter, og så komplekse som mennesker. Det fungerer som en antioxidant, noe som muligens var funksjonen for 2-3,5 milliarder år siden. Siden har melatonin fått flere ulike funksjoner, og spenner fra regulering av de cirkadianske rytmene til funksjoner innen sesongavhengig reproduksjon. Konsentrasjonen av melatonin i serum varierer med alder. Normale nyfødte danner veldig lite, men nivåene stiger relativt raskt, og blir cirkadianske og tilpasset søvnsyklusen omtrent ved 2-3 måneders alder. Om dagen holder konsentrasjonen seg lav gjennom hele livet, mens konsentrasjonen om natten blir høyest i 1-3 års alderen. Så blir den gradvis lavere gjennom puberteten på grunn av større kroppsvolum. Hos voksne følger melatoninkonsentrasjonen de daglige rytmene, med økning 2 timer før leggetid, et relativt konstant høyt nivå gjennom natten med toppnivå mellom klokken 2 og 4. Hos eldre blir melatoninproduksjonen betydelig redusert, og får derfor et langt lavere toppnivå om natten 4.

Selv om melatonin er til stede i mat som frukt, grønnsaker og hvete, bidrar dette i et vanlig kosthold svært lite i forhold til plasmakonsentrasjonen av melatonin. Det er altså melatonin som kroppen lager selv, eventuelt melatonin tatt som medisin, som bestemmer plasmakonsentrasjonen 4.

Effekter av melatonin

Melatoninreseptorer finnes i store deler av kroppen, både i ulike hjernestrukturer og i perifert vev. Melatonin har en rekke ulike effekter på kroppens funksjoner (se Tabell 5 for en oversikt), og det er stor grunn til å tro at mye ennå ikke er kjent. Det vi kan være temmelig sikre på er at den nattlige økningen av melatonin er en viktig mekanisme for fysiologien hos pattedyr, ettersom integriteten til dette signalet er konserverv gjennom evolusjonen, mens ulike regulatoriske mekanismer har blitt utviklet for å sikre opprettholdelse den rytmiske melatoninproduksjonen 23.

Søvnkvalitet og rytmeforstyrrelser

Det er liten tvil om at mennesker har bedre søvnkvalitet dersom man sover under perioden med melatoninsekresjon. Om dette skyldes melatoninpåvirkningen eller andre faktorer som har med de cirkadianske rytmene er ukjent. Dersom man har et høyt nivå av melatonin i løpet av dagen, er det klart forbundet med trangen til å ta en liten lur. Likeledes vil farmakologisk hemming av melatoninproduksjon i løpet av dagen fjerne søvnighet om dagen, mens behandling med eksogent melatonin om natten gjenoppretter nattesønnen. Eksogent melatonin kan også forsterke effekten av lysreguleringen av de cirkadianske rytmer, eller eventuelt motvirke effekten av lysreguleringen, dersom det gis på riktig tid av døgnet. Antageligvis vil behandling av mennesker med forstyrrelser i døgnrytmen, for eksempel folk som jobber i skift om natten eller folk med jet-lag, dermed ha større effekt av samtidig bruk av lysbehandling og melatonin, enn dersom de kun bruker en av behandlingsformene alene 26.

Cirkadianske rytmeforstyrrelser er et problem for helsen i det moderne samfunnet. Mange blir i dag sjelden eksponert for naturlig sterkt lys. Ønsket om full utnyttelse av alle tider på døgnet gjør også sitt til at vi får en forstyrrelse i den naturlige rytmen med lys-mørke, våkenhet og søvn. Problemet er særlig stort for de som ofte reiser på tvers av tidssoner og de som jobber skift om natten; industriarbeidere, helsepersonell, ansatte i døgnåpne butikker og bensinstasjoner, vaktpersonell og så videre. De er nødt til å jobbe i utakt med sin indre klokke, særlig om de jobber i roterende skift og ikke kontinuerlig i nattskiftet. I verste fall vil det å leve i utakt med sin indre klokke, og dermed ha dårlig søvnkvalitet, kunne føre til en rekke helsemessige problemer. Risikoen for alvorlige sykdommer har vist seg å være økt for folk som ikke har tilstrekkelig kvalitetssøvn. Forsøk har vist at dette blant annet gjelder hjertesykdommer, kreft og fedme 26.

Redusert risiko for kreft

Det er antatt at den økte risikoen for kreft, spesielt hos sykepleiere som jobber i skift, skyldes lyseksponering i løpet av natten, og dermed hemming av melatoninproduksjon. Denne hypotesen er basert på de stadig flere forsøkene som viser anti-kreft virkningen av melatonin hos dyr, samt anti-kreft virkning hos mennesker der melatonin er brukt i kombinasjon med kjemoterapi 26.

Som markør for de cirkadianske rytmer og for melatoninproduksjonen benyttes ofte måling av en metabolitt av melatonin, aMT6s, i urinen. Foreløpig er det lite forskning som viser at det produseres mindre melatonin under jobbing i natteskiift, men det er sannsynlig at dette skjer. I et forsøk der lys og 9 timers skiftarbeid ble undersøkt var det en klar reduksjon av aMT6s i urinen. Upubliserte rapporter har også vist at ved 3 dagers fast rotasjonsskiftsplan (3 tidlige skift, 3 sene skift, 3 natteskiift, hvile dager), synker den maksimale mengden av aMT6s i urin med 30% i de 3 natteskiiftene. Tilsvarende forsøk på enda raskere rotasjon (2 dagers) viste imidlertid ikke signifikante endringer 26.

Kognitive funksjoner

For mer en tre hundre år siden beskrev René Descartes pinealkjertlen som "sjelens sete". I sin "Passions of the Soul" skrev han: "...selv om sjelen er koblet til hele kroppen finnes det en spesiell del hvor den utøver sine funksjoner mer enn andre steder." Han mente at mange av våre sanseinntrykk blir sammenkoblet og styrt av klokke mekanismer i pinealkjertlen. På denne måten var pinealkjertlen involvert i sensasjon, fantasi, hukommelse og koordinering av kroppsbevegelser 27. Selv om René Descartes kanskje trakk pinealkjertlens betydning litt langt, ser vi i dag at han kan ha vært inne på noe.

En viktig hypotese går i dag ut på at vår bevissthet sammenligner og kobler nåværende sanseinntrykk med relevante elementer fra fortiden og skaper spatio-temporal hukommelse. I denne prosessen viser nye studier at både NSC og melatonin har en sentral rolle. Melatonin ser ut til å være en regulator i prosessen med å forme hukommelse, langtids potensiering og synaptisk plastisitet i hippocampus og andre hjerneområder. Dette gjøres både gjennom interaksjon med eksitatorisk og inhibatoriske nevrotransmittersystemer, samt regulering av elektrisk aktivitet og endret synaptisk transmisjon mellom hippocampusnevroner. Disse funnene antyder altså at melatonin er med på å regulere læring og hukommelse 27.

Stress og Alzheimer

I følge nye studier er stress-relaterte episoder relatert til melatoninendringer hos dyr og mennesker. For eksempel vil gjentatte episoder med separasjon fra moren føre til lave melatoninnivåer i blodet og dårlige hukommelsesprestasjoner hos unge rotter, noe som antyder en forbindelse mellom melatonin produksjon og nevroutvikling. Andre studier viser forbindelser mellom stress, melatonin og pinealkjertlen. Immobiliseringsstress fører til pinealocyttdegenerasjon, men også til økt melatonutskillelse. Nylige oppdagelser tyder på at melatonin eller dens metabolitter kan forsinke nevrodegenerative prosesser og vise beskyttende effekter mot stress 27. Forsøk har også vist at melatonin kan beskytte mot Alzheimers sykdom ved å forhindre skadevirkninger og nervecelledød fra β -amyloid 28.

Psykiske lidelser

Behandlig med lys har vist seg å kunne være effektiv mot sesongavhengig depresjon. Slike pasienter har ofte en forsinket melatonin fase om vinteren, noe friske mennesker ikke har. Den nøyaktige sammenhengen mellom melatoninproduksjon, lys og sesongavhengig depresjon er ukjent, men dette antyder en mulig mekanisme.

Lysbehandling har også blitt brukt med en viss positiv effekt hos folk med alvorlige depresjoner 26.

Melatonin er også involvert i andre emosjonelle prosesser. Det viser seg at melatoninforandringer er til stedet hos pasienter med depresjoner, schizofreni, angst, spiseforstyrrelser og andre mentale forstyrrelser 27.

Kjernetempertaur

Hos mennesker fører intravenøs administrering av eksogent melatonin til vasodilatasjon i blodårer i huden, slik at varmeavgangen øker og kjernetemperaturen synker. Endogen melatoninfrigjøring tidlig på natten antas dermed å være mekanismen for den økte hudtemperaturen og den nedsatte kroppstemperaturen som sees hos mennesker om natten 6. Ved lysstimulering om natten vil dette føre til akutt hemming av melatonin, med påfølgende økning av kjernetemperaturen 26.

Negative effekter av melatonin

Det er svært få studier som har klart å vise noen kortsiktige negative effekter som forgiftninger eller bivirkninger ved bruk av eksogent melatonin hos mennesker 26. Langtidseffektene av melatoninbruk er noe vi vet lite om.

Oversikt over virkning av melatonin

Relativt sikre virkninger av melatonin	Mulige virkninger av melatonin
<ul style="list-style-type: none">• Regulering av de cirkadianske rytmene	<ul style="list-style-type: none">• Beskytter mot kreft, hjertesykdom og fedme
<ul style="list-style-type: none">• Bedre søvnkvalitet	<ul style="list-style-type: none">• Regulere læring og hukommelse
<ul style="list-style-type: none">• Regulering av kjernetemepertatur	<ul style="list-style-type: none">• Beskyttelse mot stress
<ul style="list-style-type: none">• Antioksidant	<ul style="list-style-type: none">• Regulere immunforsvaret
<ul style="list-style-type: none">• Behandling SAD	<ul style="list-style-type: none">• Behandling diverse psykiske lidelser, depresjoner, schizofreni, angst, spiseforstyrrelser og andre mentale forstyrrelser
	<ul style="list-style-type: none">• Beskyttelse mot nevrodegenerative tilstander som Alzheimer.

Tabell 5: Oversikt over relativt sikre og mulige virkninger av melatonin.

Diskusjon

Forskning på pattedyrs lyssignaliseringskaskade har hatt dramatiske fremskritt over relativt få år. Det er liten tvil om at mennesket faktisk har en tredje fotoreseptor i øyet, den fotosensitive retinale ganglie cellen (pRGC), at denne fotoreseptoren benytter seg av melanopsin som fotopigment, at transduksjonen som benyttes ligner den brukt av virvelløse dyr. Det blir også sett på som relativt sikkert at signalene fra pRGC projiserer til, og regulerer, de cirkadianske rytmene i nucleus suprachiasmaticus (NSC), der kroppens hovedklokke sitter. Her bidrar klokkegener med negative tilbakemeldingssløyer til de rytmiske syklene. Projeksjonen fra NSC til pinealkjertlen er også velkjent, og med de siste oppdagelsene rundt AANAT, "the timezym", har man et relativt klart bilde av hvordan signalene fra NSC regulerer syntesen av melatonin. Med andre ord er de store trekkene regnet som kjent, bekreftet av mange uavhengige forsøk.

Det er likevel flere kritiske områder hvor vår forståelse er svært mangelfull. Det at aksjonsspektrumet for mennesker i en del forsøk har vist λ_{maks} helt ned i 420 nm stemmer dårlig med forsøkene med andre pattedyr. Sannsynligvis vil det med bedre målemetoder vise seg at λ_{maks} er på omtrent 480 nm også hos mennesker, ettersom all forskning viser at det er snakk om samme fotopigment, melanopsin. Også når det gjelder egenskapene til pRGC og melanopsin er mye uklart. Hvordan klarer pRGC å integrere lyssignaler over lengre tid? Og hvorfor blir pRGC uttrykt såpass tidlig og i så stort omfang i utviklingen? Hva er grunnen til at vi har to typer melanopsin? Samspillet mellom staver, tapper og pRGC er også i stor grad uavklart. Selv om mye tyder på at fototransduksjonen hos mennesker foregår på samme måte som hos virvelløse dyr, må dette undersøkes nøye før endelige konklusjoner kan fattes.

Forståelsen av hvordan NSC genererer rytmene har de siste årene begynt å ta form, særlig med oppdagelsen av klokkegenene. Likevel mangler også her dybdeforståelsen. Hva som regulerer rytmene utenom lys, og hvordan disse regulerende faktorene bare virker under visse deler av syklusen er nokså uklart. Videre er to ulike melatoninreseptorer oppdaget, uten at betydningen deres er kjent. Når det gjelder regulering av melatoninsyntesen vet vi relativt klart hvordan den akutte virkningen av lys fungerer, men ikke hvorfor melatoninproduksjonen reduseres betydelig før det blir lyst. Her er det andre ukjente faktorer som spiller inn.

Virkningen av melatonin er lite kjent i forhold til virkningen av andre hormoner i kroppen. Vi vet at melatonin virker inn på regulering av døgnrytmen, samt temperaturregulering. Det vi ikke vet nok om er innvirkning på søvnkvalitet, somatiske sykdommer som kreft, immunsystemet, kognitive funksjoner som læring og hukommelse, stress, psykiske lidelser og ikke minst eventuelle negative effekter av feil bruk av hormonet. I tillegg er det lett å tenke seg områder som vi ennå ikke har oppdaget.

En del forsøk har også vist nye områder hvor pRGC kan spille en viktig rolle. Aksoner fra pRGC projiserer ikke bare til NSC, men også til andre hjerneavsnitt. Dette er områder som kan ha betydning for vår årvåkenhet, våre kognitive funksjoner og kanskje visuelle system. Her spiller nok også melatonin en viktig rolle. Likevel er forskningen på dette området bare i startgropen, så vi kommer nok til å få mange overraskelser når dette undersøkes nærmere.

Bruk av melatonin som medisinsk behandling

Etter å ha gått gjennom den lange listen med positive effekter av melatonin (se Tabell 5), er det fort gjort å tenke at det bør være fantastisk å kunne utnytte dette som medikamentell behandling. Det gjøres også til en viss grad i dag, særlig i behandling av pasienter som lider av cirkadianske rytmeforstyrrelser. Samtidig er medikamentet blitt et populært produkt på det åpne "helseprodukt"-markedet i blant annet USA, og brukes da som sovemedisin. Enkelte betrakter da også melatonin som "alternativ medisin" 4. Likevel gir studier ingen entydige klare svar på den kliniske nytten av melatonin som medikament. Noen studier viser at melatonin har god effekt i forhold til utvalgte lidelser, mens andre ikke påviser noen signifikant effekt.

Det å ta for seg denne problemstillingen faller riktignok utenfor denne prosjektoppgaven, men det som i hvert fall er klart er at det er et stort behov for mer forskning på området. Dette behovet forsterkes av at såpass mange allerede bruker melatonin daglig i den tro at det virker bra og at det ikke har noen bivirkninger. Med dagens begrensede kunnskap om melatoninets faktiske virkninger kan det være en farlig holdning.

Selv om vi til nå ikke har funnet noen vesentlige negative effekter av melatoninbruk på kort sikt, bør vi ikke tolke dette som om vi har å gjøre med et vidundermedikament uten bivirkninger. Da er det bedre å ha den holdningen at alle stoffer som tilføres kroppen kan være giftig, særlig om det er tatt i feil dose eller til feil tid.

Klinisk betydning av oppdagelsen av den nye pRGC

Selv om mye gjenstår i forståelsen av den nye fotoreseptoren og signalkaskaden den setter i gang, har oppdagelsen forandret hele vårt syn på funksjonen til vårt visuelle og ikke-visuelle apparat – alt fra forståelsen av anatomi, fysiologi, signaltransduksjon og oppførsel til hvordan dette kan utnyttes i forståelse og behandlingen av pasienter med forstyrrelser i syn og døgnrytmer. Det er altså ikke bare et nytt og spennende felt innen sensorisk biologi, men det har viktige kliniske aspekter. Blant annet bør klassifisering av blindhet omdefineres. Å være blind i dag omfatter kun visuell blindhet, men hva med de som i tillegg har non-visuell blindhet, og dermed mister tidssansen i tillegg? Øyeleger har nå begynt å ta hensyn til dette, og kliniske retningslinjer blir endret for å også ta hensyn til pasientenes eventuelle forstyrrelser i de cirkadianske rytmer 1.

Videre er det stor sannsynlighet for at det finnes medisinske tilstander der pRGC mangler, men der staver og tapper fortsatt er bevart. Vi kan forvente at slike personer har problemer med deres cirkadianske fysiologi og søvnrytme. På bakgrunn av dette bør vi kanskje undersøke om det er defekter i ekspresjonen av klokkegener parallelt med undersøkelse for defekter i melanopsin fototransduksjonskaskaden når vi leter etter

årsaken til for eksempel sykdommer som forsinket søvnfasesyndrom eller non-24-timers søvn-våkenhetsrytme 1.

Projeksjonene fra pRGC til avsnitt i hjernen som har med viderformidling av visuell informasjon er også et aspekt som bør undersøkes nærmere. Dersom det er slik at blinde med intakte pRGC kan få et bevisst inntrykk av om det er lyst eller mørkt, og dermed et svært begrenset visuelt syn, så vil det naturlig nok ha store konsekvenser for deres livskvalitet.

Litteratursøket

Selv vurderer jeg at metoden som ble benyttet ved litteratursøket var solid nok for denne prosjektoppgaven. Det at jeg valgte å unngå å begrense søket for mye ved bruk av kombinasjoner av keywords hadde både fordeler og ulemper. Ulempen er at det tok lengre tid å gå gjennom søkeresultatene. Det kan også være at jeg dermed gikk gjennom de enkelte søkeresultatene mindre grundig enn jeg ville gjort om listen var kortere. Det at jeg begrenset søket til artikler etter 2005 kan på den annen side ha begrenset søket for mye. Jeg føler meg likevel rimelig sikker på at jeg ved bruk av denne metoden ikke har gått glipp av viktige artikler som ville endret vesentlig på resultatet.

Generelt var det god samstemming mellom de ulike artiklene, i hvert fall de som var av nyere dato. Oversiktsartiklene refererte stort sett til samme funn, og hadde stort sett samme konklusjoner, selv om vinklingen kunne være annerledes. Artikler fra for eksempel 2001 eller enda tidligere var derimot mindre egnet på grunn av en del utdatert informasjon, og viser hvor fort utviklingen går på forskningsfronten. Det forteller vel på sin side også at mange av resultatene jeg har beskrevet ikke lenger vil være relevante om få år. Likevel vil slike oversikter over hva vi i dag vet kunne være en god plattform for videre forskning.

¹Litteraturhenvvisninger

Foster RG, Hankins MW (2007): Circadian vision. *Current Biology*, Vol 17, No 17, R746

² Hannibal J (2006): Regulation of Melanopsin Expression. *Chronobiology International*, 23 (1&2): 159-166

³ Harrisingh MC, Nitabach MN (2008): Integrating Circadian Timekeeping with Cellular Physiology. *Science*, 320, 879-880.

⁴ Brennan R, Jan JE, Lyons CJ (2007): Light, dark and melatonin: emerging evidence for the importance of melatonin in ocular physiology. *Eye*, 21, 901-908.

⁵ Hankins MW, Peirson SN, Foster RG (2007): Melanopsin: an exciting photopigment. *TRENDS in Neurosciences*, Vol 31 No 1.

⁶ Zee PC, Manthena P (2007): The brain's master circadian clock: Implications and opportunities for therapy of sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*, 11, 59-70.

⁷ Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, Foster RG (1999): Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284:502-504

⁸ Lucas RJ et al (2001): Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat. Neurosci.* 4, 621-626.

⁹ Fu Y et al (2005): Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Curr. Opinion in Neur.Biol.* 15, 415-422.

¹⁰ Dacey DM et al (2005): Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN. *Nature*, 433, 749-754.

¹¹ Melyan Z et al (2005): Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433, 741-745.

¹² Bellingham J, Foster RG (2002): Opsins and mammalian photoentrainment. *Cell Tissue Res.* 309, 57-71.

¹³ Zaidi FH et al. (2007): Short-Wavelength Light Sensitivity of Circadian, Pupillary, and Visual Awareness in Humans Lacking an Outer Retina. *Curr. Biol* 17, 2122-2128.

¹⁴ Van Gelder RN (2007): Non-visual Photoreception: Sensing Light without Sight. *Curr. Biol.* Vol 18 no 1, 38-39.

¹⁵ Qiu X et al (2005): Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745-749.

¹⁶ Peirson SN et al (2007): Macroarray analysis and functional genomics identify novel components of melanopsin signaling. *Curr. Biol* 17, 1363-1372.

¹⁷ Güler AD et al. (2008): Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, vol 453, 102-106.

¹⁸ Baver SB, Pickard GE et al. (2008): Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur Jour. Of neuroscience*, vol 27, 1763-1770.

¹⁹ Sherwood L: *Human Physiology. From Cells to Systems*, 5th ed. ISBN 0-534-39536-8. Thomson Learning, NY 2004.

²⁰ McArthur AJ, Gilette MU, Prosser RA (1991): Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res*, 565(1), 158-161.

²¹ Dubocovich ML (2007): Melatonin receptors: Role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep medicine* 8, 34-42.

- ²² Falcón J (2007): Nocturnal Melatonin Synthesis: How to Stop It. *Endocrinology*, 148(4), 1473-1474.
- ²³ Schomerus C, Korf HW (2005): Mechanisms Regulating Melatonin Synthesis in the Mammalian Pineal Organ. *Ann. N.Y.Acad. Sci.*, 1057, 372-383.
- ²⁴ Klein DC (2007): Arylalkylamine N-Acetyltransferase: “the Timezyme”. *The Jour. of Biol chemistry* vol 282, no 7, 4233-4237.
- ²⁵ Klein DC, Weller JL, Moore RY (1971): Neural Regulation of Pineal Serotonin: Acetyl Coenzyme A N-Acetyltransferase Activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 3107-3110.
- ²⁶ Arendt J (2006): Melatonin and human rythms. *Chronobiology International*, 23:1, 21-37
- ²⁷ Bob P, Fedor-Freybergh P (2008): Melatonin, consciousness and traumatic stress. *J.Pineal Res*, 44, 341-347.
- ²⁸ Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, Efthimiopoulos S, Robakis NK (1997). Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 17 (5): 1683 – 1690.